

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 64-003560

(43)Date of publication of application : 09.01.1989

(51)Int.Cl.

G01N 33/48
B25J 7/00
C12M 1/00
G02B 21/32
G02B 21/36

(21)Application number : 63-130496

(71)Applicant : CARL ZEISS:FA

(22)Date of filing : 30.05.1988

(72)Inventor : KETTLER ALBRECHT
NASSE HUBERT
GEIS WALTER
WILKE VOLKER
ANSORGE WILHELM

(30)Priority

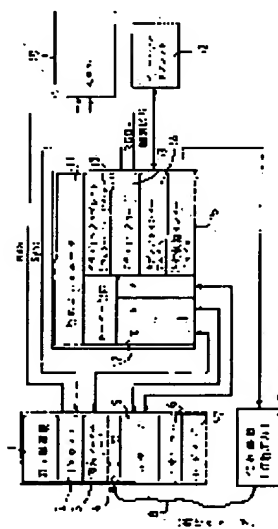
Priority number : 87 3718066 Priority date : 29.05.1987 Priority country : DE

(54) METHOD FOR INJECTING SMALL AMOUNT OF LIQUID INTO CELL OR SUCKING INDIVIDUAL CELL OR ALL CELLS FROM CELL CULTURE AND WORKSTATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To quickly and surely conduct work by converting picture coordinates into the object coordinates of a cell carrier positioning device and positioning capillary tubes to the object coordinates calculated relatively to each cell.

CONSTITUTION: The stage 5 of a microscope 1 is moved in the x-, y-, and z- directions by means of the motor control section 17 of a computer 11. Capillary tubes 4 are connected to an injecting device 9 through a pressure resistant tube 8, fixed to a certain moving device, and obliquely gets in a sample container on the stage 5. A graphic card 13 is connected to a monitor 10 containing a mixing stage and a mark generated from the card 13 is superimposed upon the video signal of a TV camera 2. A marker is sent to the picture of the monitor 10 by using a graphic tablet 12. The computer 11 is connected to the injecting device 9 of the capillary tube 4 through an interface 15 and controls the injecting time and injecting amount of the device 9. The injecting pressure of the device 9, in addition, is also controlled by time in accordance with the movement of the tube 4. Therefore, work can be carried out quickly and surely.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-3560

⑤Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬公開 昭和64年(1989)1月9日

G 01 N 33/48

B 25 J 7/00

C 12 M 1/00

M-8305-2G

8611-3F

A-8717-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 16 (全11頁)

⑭発明の名称 細胞中へ微量注射、ないしは個々の細胞から吸引または細胞培養から全細胞を吸引する方法および作業ステーション

⑯特 願 昭63-130496

⑰出 願 昭63(1988)5月30日

優先権主張 ⑱1987年5月29日⑲西ドイツ(DE)⑳P3718066:5

㉑発 明 者 アルブレヒト・ケトラ ドイツ連邦共和国アーレン・ヘルメリンシュトラッセ 40
ー ー0

㉒発 明 者 フーベルト・ナツセ ドイツ連邦共和国アーレン・グアルクシュトラッセ 86

㉓発 明 者 グアルター・ガイス ドイツ連邦共和国アーレン・ハルトシュトラッセ 26

㉔出 願 人 カール・ツアイス・ス ドイツ連邦共和国ハイデンハイム・アン・デル・ブレンツ
チフツング (番地なし)

㉕代 理 人 弁理士 矢野 敏雄 外1名

最終頁に続く

明 細 書

1 発明の名称

細胞中へ微量注射、ないしは個々の細胞から吸引または細胞培養から全細胞を吸引する方法および作業ステーション

2 特許請求の範囲

1. 細胞中へ微量注射するか、ないしは個々の細胞から吸引するかまたは細胞培養から全細胞を吸引するため、その場合顕微鏡(1)下に接続されたテレビカメラ(2)で観測された細胞に相対的に毛管(4)が位置決めされる方法において、

ーテレビ画像にマーカー(30)が重ねられ、

ーマーカー(30)が、画像(10)およびマーカー(30)間の相対運動により、注

射すべき細胞(31)にテレビ画像中で位置決めされ、かつ標識された細胞の画像座標がコンピュータ(11)に記憶され、

ーこの画像座標が、コンピュータにより毛管(4)ないしは細胞キャリア(5)の位置

決め装置(19, 20, 21)の物体座標へ換算され、

ーかつ引続き、毛管(4)が、それぞれの細胞(31)に相対的に、計算された物体座標へコンピュータ制御により位置決めされることにより、選択された細胞(31)中へ注射されるかないしはこれら細胞から吸引されることを特徴とする、細胞中へ微量注射、ないしは個々の細胞から吸引または細胞培養から全細胞を吸引する方法。

2. 毛管(4)の毛管方向への穿刺運動が、毛管(4)ないしは細胞キャリア(5)の位置決め装置(19~21)の運動を2つの座標で毛管(4)の傾斜角(θ)に相応に重ねることにより行なわれる請求項1記載の方法。

3. サンプル範囲が、相互に連続する一定寸法の多数の区画(33, 34)に分割され、かつテレビ画像に、像区画の境界線、並びにそれぞれの像区画の識別記号が重ねられる請求項1記載の方法。

4. 細胞が、基準標線(35)を有する容器(18)中に配置され、かつ像座標系が、予め実施された校正工程で、テレビ画像中で視認可能な基準標線と一致される請求項1記載の方法。
5. 注射—または吸引工程後に、処理された細胞(31)の座標が識別記号と一緒に、並びに基準標線(35)の座標が永久的に記憶される請求項1記載の方法。
6. コンピュータ制御された注射ないしは吸引工程前に、手動により試験工程が実施され、その場合毛管尖端(40)および細胞(31)の座標が一致されかつコンピュータにより記憶される請求項1記載の方法。
7. 注射時間ないしは注射量または吸引量の制御が、コンピュータ(11)により、所定の値に相応に行なわれる請求項1記載の方法。
8. 毛管(4)の、細胞(31)への穿刺運動の速度が選択可能である請求項1記載の方法。
9. 注射圧力の時間的経過が、コンピュータ(

—かつ引続き、毛管(4)が、それぞれの細胞(31)に相対的に、計算された物体座標へコンピュータ制御により位置決めされることにより、選択された細胞(31)中へ注射されるかないしはこれら細胞から吸引される方法を実施する装置において、

—少なくとも2つの方向に位置決め可能な物体ステージ(5)を有する顕微鏡(1)、

—顕微鏡による像をモニター(10)に表示するためのテレビジョン装置(2)、

—接続された記憶装置(12)、およびモニター(10)に図形記号を重ねる装置(13)を有する図形処理可能なコンピュータ(11)、

—図形記号をモニター(10)上で位置決めする装置(14)、

—固定された注射ユニット(4, 28)ないしは吸引ユニットを有し、少なくとも1つの方向にコンピュータ(11)により位置決め可能である微動マニピュレータ(3)、

11)により、毛管(4)の運動工程に相応に制御される請求項1記載の方法。

10. 注射または吸引すべき細胞が画像解析装置により選択される請求項1記載の方法。

11. 細胞中へ微量注射するか、ないしは個々の細胞から吸引するかまたは細胞培養から全細胞を吸引するため、その場合顕微鏡(1)下に接続されたテレビカメラ(2)で観測された細胞に相対的に毛管(4)が位置決めされる方法であって、

—テレビ画像にマーカー(30)が重ねられ、

—マーカー(30)が、画像(10)およびマーカー(30)間の相対運動により、注射すべき細胞(31)にテレビ画像中で位置決めされ、かつ標識された細胞の画像座標がコンピュータ(11)に記憶され、

—この画像座標が、コンピュータにより毛管(4)ないしは細胞キャリア(5)の位置決め装置(19, 20, 21)の物体座標へ換算され、

—注射ないしは吸引すべき細胞(31)を収容するサンプル容器(18)

—並びに、グラフィック装置(13, 14)を経て特定された像座標を物体座標に換算し、かつ微動マニピュレータ(3)ないしは物体ステージ(5)をコンピュータ(11)により制御するための計算プログラムを特徴とする、細胞中へ微量注射、ないしは個々の細胞から吸引または細胞培養から全細胞を吸引するための作業ステーション。

12. サンプル容器(18)に、顕微鏡ステージ上の容器の位置検出に役立つ可視標線(35)が設けられている請求項1記載の作業ステーション。

13. 注射ユニットの毛管(4)が、その姿勢角 θ に関し顕微鏡(1)の光軸(36)に相対的に調節可能である請求項1記載の作業ステーション。

14. 注射ユニットが、毛管(4)を軸方向に移動させるための駆動装置を有する請求項1

記載の作業ステーション。

15. コンピュータ(11)に、物体ステージ(5)ないしは微動マニピュレータ(3)の駆動装置の制御部(16)が接続されている請求項11記載の作業ステーション。

16. 計算プログラムが、グラフィック装置を経て特定された多数の像座標組ないしはこれから計算された物体座標組の記憶を備えている請求項11記載の作業ステーション。

3 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、細胞中へ微量注射するか、ないしは個々の細胞から吸引するかまたは細胞培養から全細胞を吸引するため、その場合顕微鏡下に接続されたテレビカメラで観測された細胞に相対的に毛管が位置決めされる方法およびこの方法を実施する装置に関する。

従来の技術

生物学的研究並びに遺伝子工学では、生細胞中への物質の装入が重要な役割を果たす。これに

Mikroinjektion in lebende Zellen, 刊行物 Nr. W 4 1 - 1 3 1 - d (X 8 6)] からは、倒立顕微鏡をベースとし、そのステージに、光軸に対し斜めに整列されたガラス毛管が微動マニピュレータを介し固定された装置が記載されている。この毛管が、微動マニピュレータを使用し3軸で照準されて、顕微鏡のステージに配置された培養容器中で移動されることができる。顕微鏡下に可視的に観測される細胞中へ注射するため、以下の工程が実施されなければならない：

差当り、毛管先端が大体において対物レンズの視野へ入れられる必要がある。引続き、毛管の先端が微動マニピュレータ(x, y)の運動により関連する細胞上に位置決めされる。引続き、z方向への、すなわち顕微鏡の光軸に平行な運動により、毛管先端が細胞中へ入れられ、注射装置が作動され、かつ毛管が、十分に物質が細胞中へ入った後に再び押上げられる。この場合、注射が毛管の軸方向に行なわれない。

は1連の種々の方法がある：従って例えば、搬入すべき物質が差当り細胞を包囲する媒体中へ装入されることがある。ところで物質が細胞中へ入ることができるため、細胞膜が浸透されなければならない。このことが、無照準の機械的、電気的または化学的刺激によるか、または細胞に集束されたレーザー光により行なわれることができる。

これら全ての方法は、細胞中へ装入されるべき物質が大部分包囲媒体中に残存するという欠点を有する。とりわけ前述の方法によれば、物質を照準的に細胞の核中へ装入することが不可能である。従って開発されたのは、物質が、終端部が微細な先端に延長されたガラス毛管を使用し、直接に個々の細胞または細胞核中へ注射されることのできる方法である。

従って例えば、カール・ツァイス社(Firma Carl Zeiss)のカatalog "アルバイツブラツツ・ツァ・ミクロインジェクツイオーン・イン・レーベンデ・ツエレン" [Arbeitsplatz zur

前述の純手動的方法是、正確に連続的に実施すべき多数の独立工程を必要とし、その場合細胞に正確に命中し、かつとくに毛管が極端に沈下せずかつ従って折損しないため若干の経験が必要である。さらに、細胞中への穿刺が毛管の軸方向に行なわれず、その結果細胞膜が注射工程により相対的に著るしく損傷される。

西ドイツ国公開特許明細書第3511700号から公知の他の注射装置は、垂直方向に配置されかつ倒立顕微鏡のフォーカシング作動に連動された毛管を有する。この装置の場合、毛管は、毛管の顕微鏡焦点深度範囲内の運動が細胞への穿刺を生じるように、はじめにまずz方向に調整される必要がある。引続き、注射されるべき細胞が物体案内装置を使用し、不正確に検出可能であるにすぎない毛管先端下へ移動される。その後、毛管がフォーカシング駆動装置を使用し降下され、その場合これが軸方向に細胞中へ侵入することにより、実際の注射工程が実施され：注射の行なわれた後、毛管が再び押

上げられる。

この装置の場合、毛管先端は、容器底面に達した際に折損または少なくとも栓塞する惧れがとくに大である、それというのも毛管先端が容器底面に垂直に当るからである。さらに、すでに注射された細胞に関する全体的状況が極めて容易に失なわれる、それというのも顕微鏡のステージがそれぞれの注射に際し移動され、それにより視野が連続的に変るからである。

この全ての結果として、公知の手動による細胞注射装置を使用し熟練者でさえ毎時約300個以上の細胞に注射することができない。

さらに公知であるのが、細胞からの液体の吸引、または細胞培養からの全細胞の吸引を備えた微生物学的方法である。またこの場合、1つの毛管が細胞中へ穿刺されるか、ないしは毛管が吸引すべき細胞に位置決めされる。原則としてこの方法の場合、前述に注射の例で記載したと同じ作業工程が進行し、かつ作業速度の点で同じ制限が存在する。

れた細胞中へ注射されるかないしはこれら細胞から吸引されることを特徴とする方法により解決される。

本発明による方法において、コンピュータが、位置決め、および毛管の細胞への穿刺を制御する。この制限的な運動工程が今度は自動的に行なわれるので、大きい作業速度が得られることができ、かつ毛管が誤操作により折損するという惧れが著るしく低減される。オペレータは、さらに注射または吸引すべき細胞をモニター像中で標識する必要があるにすぎない。本発明を有利に発展させた場合、この工程を、特定種類の細胞または特定成育状態の細胞をその幾何学的形状で自動的に検出する像解析装置により実施することさえ可能である。

本発明による方法は、細胞中への一定深さの穿刺運動を保証し、かつ従って細胞損傷の種類と程度の点で、従来の手動により制御される方法よりも再現可能な結果が得られる。さらに、毛管の細胞中の滞在時間およびそれとともに注

射が解決しようとする課題

本発明の課題は、細胞に注射するか、ないしは個々の細胞から吸引するか、または細胞培養から全細胞を吸引するための、公知の装置よりも迅速かつ確実な作業を許容する装置をつくり出すことである。

課題を解決するための手段

本発明によればこの課題が、前述の方法において、

- テレビ画像にマーカーが重ねられ、
- マーカーが、画像およびマーカー間の相対運動により、注射すべき細胞にテレビ画像中で位置決めされ、かつ標識された細胞の画像座標がコンピュータに記憶され、
- この画像座標が、コンピュータにより毛管ないしは細胞キャリアの位置決め装置の物体座標へ換算され、
- かつ引続き、毛管が、それぞれの細胞に相対的に、計算された物体座標へコンピュータ制御により位置決めされることにより、選択さ

射または吸引容積が極めて正確に予定可能および再現可能である。

さらにコンピュータを使用し、すでに処理された全ての細胞の座標を記憶することが可能である。これにより使用者が、すでに処理した細胞およびその数を不断に知ることができる。またこの場合可能であるが、不断に工程を中断しかつその後の時点で正確に同じ位置から継続することである。さらに、例えば注射の効果が、注射された細胞、および注射されなかった細胞の成育を比較することにより長期間にわたり検査されることができる。有利にこの方法は、細胞が基準標線の設けられた容器中に配置され、かつ注射された細胞の座標が基準標線の座標と一緒に記憶されることにより達成され、その結果個々の細胞の確実な再発見がサンプル容器を交換した後も保証される。

毛管を軸方向に穿刺運動させるため、固有の駆動装置が備えられることができる。しかしながら、コンピュータが、手動制御の場合は殆ん

ど不可能であるような方法で多数の運動を相互に調整するので、この毛管方向への穿刺運動が、別個の駆動装置を毛管の軸方向に備える必要なしに実施されることもできる。コンピュータ制御が、所望の運動工程を、顕微鏡ステージの移動およびマニピュレータの z 軸降下を重ねることにより合成することができる。

さらに有利なのは、全てのサンプル範囲が多数の相互に連続する区画に分割され、これら区画がコンピュータ制御により連続的に送られる場合である。この場合、識別記号の設けられた対応視野が、使用者により系統的に連続的に処理済とされることができる。この方法で、細胞の多数回注射または失念が確実に回避される。

実施例

以下に、本発明を図面実施例につき詳説する。

第1図によるブロック系統図に示した細胞注射装置が倒立顕微鏡1に形成され、この顕微鏡は、この目的で長い焦点距離を有するコンデン

接続され、この注射装置が、毛管からの注射液流出を惹起し、かつ保持圧力、注射圧力および洗浄圧力の調節を可能にする。

前述の構成部材は、前記公知技術で記載した公知の微量注射装置で挙げられているので、本明細書ではもはやこれを詳述しない。

すでに述べたように、顕微鏡のステージ5がモーターにより可動である。 x -および y 方向へのステージ運動用の2つの駆動装置が、第2図による詳細図中に19ないしは20で表わされている。同じく微動マニピュレータ3が、モーターにより駆動装置21を経て、それも詳しくは z 方向に移動されることができ、さらにこの微動マニピュレータの、毛管4の固定されたホルダ27が、 x -および y 方向運動のための移動装置を有する。この場合、前述の実施例において、手動により作動すべき調節ノブ24および26が備えられているが、但しこれら運動のためにモーターによる駆動装置を使用することも可能である。

デンサを有し、かつ種々の光学的コントラスト形成法、例えば位相コントラストおよび示差干渉コントラストのための交換可能な装置（図示せず）が設けられている。この顕微鏡1は、種々の結像倍率を有する対物レンズ用のレボルバ7を有する。

対物レンズレボルバ7上に、2つの座標（ x 、 y ）方向にモーターにより可動な走査ステージ5が配置され、このステージはステップ分度度 $0.25\mu m$ を有し、かつ選択可能な速度で移動されることができる。第2図による斜視図から明白なように、ステージ5が、注射すべき細胞を含有するサンプル容器18用のホルダを有する。

さらに顕微鏡1に、TVカメラ2、および3で表わされた、注射用毛管4を支持する微動マニピュレータが固定されている。このテレビカメラを使用し、処理すべき細胞培養の拡大像がモニター10に可視化されることができる。

毛管4が耐圧チューブ8を経て注射装置9に

毛管4が、顕微鏡1のステージ5上のサンプル容器18中へ斜めに侵入し、その場合毛管のステージ面に対する傾斜角が、毛管のホルダ27を軸29回りで旋回させることにより調節されることができる。

第2図に示した、毛管4ないしはサンプル容器18の位置決め装置の構造も、その構成部材自体が公知である。

本発明によれば、走査ステージ5の駆動装置19および20、および微動マニピュレータの z 運動用の駆動装置21が、第1図に11で表わされたコンピュータのモーター制御部に接続されている。例えばこのコンピュータで挙げられるのが、IBM PC/XTのような図形処理可能なパーソナルコンピュータである。同じく、コンピュータ11のグラフィックカード13がモニター10に接続されている。さらに、顕微鏡1のテレビカメラ2が、外部からグラフィックカードの同期パルスにより同調される。モニター10が混合段を包含し、この混合段中

でグラフィックカード13から生じた記号がテレビカメラ2のビデオ信号に重ねられる。

さらに、コンピュータ11にグラフィックタブレット12が接続され、このタブレットを使用し、後述するように使用者がグラフィックカードから生じたマーカーをモニター10の画像に送ることができる。明白にグラフィックタブレットの代りに、マウス(Maus)、いわゆるローリングボール(Rollkugel)またはジョイスティック(Joystick)もマーカーの移動を制御するために使用されることができる。

さらに制御コンピュータ11が、注射装置インターフェイス15を経て毛管4の注射ユニット9に接続され、かつとくに注射時間およびそれとともに細胞中へ注射すべき液体の量を制御する。またインターフェイス15を経て、注射圧力が、毛管の行なう運動工程に相応に時間により制御されることができる。例えば、注射前は、毛管中への液体の逆流を阻止するためわずかな過剰圧力に調節され、穿刺運動中は、毛管

鏡の軸36へ送られる。

圧力の制御がコンピュータにより行なわれない場合、所望の注射—ないしは保持圧力が注射装置9で調節される。

データ入力

引続きコンピュータ11中で、作業経過の制御に使用されるプログラムが呼出される。このプログラムが、プログラム実施に必要な若干のパラメータ：使用される対物レンズの像倍率、毛管4のステージ面に対する傾きである注射角 θ を求める。さらに、選択することが可能であるのが、相互に隣接しかつ、モーター駆動のステージ5がコンピュータ制御下に連続的に移動する区画の数である。次いで第3図に示すように、対応する視野33、34が、これにグラフィックカード13により形成された録および識別記号31が設けられてモニター10に表示される。またこの位置で、注射モードが、例えば注射液の毛管からの連続的流出または毛管の細胞への穿刺後だけの流出のように選択されるか

の栓塞を回避するため注射圧力が高められ、かつ引続き実際の注射圧力に調節される。

ところで、前述の装置を使用する微量注射が以下のように経過する：

前作業

細胞容器18が顕微鏡ステージ5に固定される。第4図に例示した容器の底面に、2つの基準標線35a、35bが取付けられている。これら基準標線を使用し、容器18は、これら標線がステージのほぼx方向を向くように整列される。さらにこれら基準標線は、画像座標系の原点を明白な方法で制限し、かつ容器18中に存在する細胞の再発見を許容する。さらに有利でありうるのは、細胞容器18の底面に、相互に隣接する区画を標識するため規則的なパターンで搔き傷を入れることである。

引続き毛管が、注射液を充填され、毛管ホルダ27へ挿入され、かつ回転ノブ24および26を使用しコンデンサ32下に手動によりx、y移動されることにより、視野中のほぼ顕微

鏡の軸36へ送られる。ないしは所望の圧力曲線が入力されることができる。さらに可能であるのが、毛管の穿刺運動の速度を選択することである。例えば、柔軟な細胞膜を有する細胞には、相対的に硬質の細胞膜を有する細胞に対するよりも大きい速度が必要である。

容器位置

グラフィックタブレット12および、モニター10の受像面の使用下に手動制御により行なわれるデータ入力後に、受像面に、顕微鏡により得られた像が呼出され、容器底面に焦点が合せられ、かつ容器底面の2つの基準標線が移動される。この場合、グラフィックタブレットが、顕微鏡対物レンズ上のステージ位置を制御するために使用される。

引続き、容器底面の基準標線が、第3図中に表わした矢形のカーソル30で標識され、かつこの場合これら容器標線の位置が、コンピュータの座標系と一致される。コンピュータが標線の任意の位置をすでに識別した場合、すなわち

このことが該当するのは、例えば、標準化された容器が使用された場合、または容器をステージから除去せずに中断された注射が続行される場合であるが、コンピュータがこれら標識自体をテレビカメラの視野中へ送ることができ、かつオペレータは、容器底面の標線の正確な位置をカーソルで標識することだけが必要である。

毛管調整／試験注射

容器を正確に位置決めした後、フォーカシング作動で毛管先端に焦点が合せられ、かつこの毛管先端が微動マニピュレータ3のx/y移動装置24, 26を使用し顕微鏡視野のほぼ中心へ送られる。引続き、容器底部の細胞の面へ焦点が合せられる。

その後に毛管が、グラフィックタブレット12を介する制御下に、毛管4の先端が1つの細胞中へ侵入するまで相互作用により降下される。この位置がコンピュータに伝達され、その結果次いでコンピュータが、その後の自動注射に

し、受像面のカーソル標識30が、注射されるべき選択された細胞に連続的に配置される。それらの、受像面座標系の座標が、キーを押すことによりその都度コンピュータに送られかつそこに記憶される。コンピュータが、標識された細胞の座標を処理し、かつ視野中で標識された細胞の数並びに標識された細胞の総数を不断に表示する。さらに、それぞれ標識された細胞の像に第3図中の方形の区域標識38ないしは39が重ねられ、それにより標識された細胞が表示される。

また可能なのが、選択された細胞の座標を、これら細胞をステージ5の移動により、例えば像中心に固定されたカーソルマーク30下へ送ることにより検出することである。その後にキーを押すことにより、ステージ座標がコンピュータへ送られる。

標識が誤って配置された場合、この配置された標識を再び消去することが可能であり、それにより、細胞が連続的な自動注射に際し毛管に

おけるz運動の程度に関する情報を有する。毛管先端の、像座標系のx/y面における位置が、カーソル30のその先端が毛管先端に位置決めされることにより、コンピュータに送られる。

次いで受像面で、試験注射の実施されるべき細胞が、この細胞を同じくカーソル30で標識することにより選択される。標識した後、コンピュータが毛管先端を自動的に標識位置へ移動させ、かつこの場合細胞を穿刺させる。その際毛管が十分に細胞中へ侵入しない場合、毛管が、試験注射の成功するまで再び降下される。この場合、調整工程中に得られたz降下値の補正が行なわれる。

この試験注射中に、コンピュータにより維持されるべき毛管の細胞中滞留時間、並びに注射圧力が測定され、かつ場合により変更されることができる。試験注射が成功した場合、実際の定常的注射が開始されることができる。

視野中の細胞を標識する

このためグラフィックタブレット12を使用

より突当てられることが阻止される。

標識された細胞の注射

注射工程は、コンピュータにより制御されるが、但し、例えば毛管が栓塞せる場合には不断にオペレータにより中断されることができる。自動注射工程中に、コンピュータが、標識された細胞の視野中の座標を、ステージ5および、微動マニピュレータ3のz駆動装置21の制御に必要な作動系の座標値に変換する。引続きコンピュータが、毛管先端を標識された細胞に相対的に移動させ、かつ毛管先端を、所定の毛管傾斜角に相応に合成された運動により細胞を毛管の先端で穿刺することにより細胞中へ位置決めし、予定された時間中、注射装置9の弁を開き、毛管を後退させかつ次の標識された細胞へ移動させる。

また可能であるのが、細胞の穿刺を、毛管4を軸方向に運動させる駆動装置により惹起することである。このような駆動装置は、毛管ホルダ27中に配置されたモーターより成ることが

でき、このモーターが、毛管4の先端が処理すべき細胞に関する所定の位置に達すると、直ちにコンピュータ11により駆動される。

隣接視野の探索

はじめに、幾つの視野をx-およびy方向に処理すべきかが決定された場合、先行する視野に直接に引続く次の視野が自動的に移動される。決定がないか、または全ての決定された視野がすでに処理された場合、次の視野がオペレータにより選択される。このため、ステージが自由にまたはそれぞれ正確に1つの視野だけx-またはy方向に移動されることができる。この場合、視野ラスタ内部の瞬間的位置が識別記号33により表示される。ステージの移動に際し、すでに細胞が注射された視野に入った場合、多数回注射を正確に回避するため、これら細胞に、同じくモニター画像上で区域標識が設けられる。

最後の3つの部分的工程：

1. 使用者によりカーソルを使用して細胞を標

幾何学的校正

幾何学的校正は、装置のはじめの作動開始に際し必要であるにすぎない。この校正は、細胞のモニター上の位置から顕微鏡ステージ上の実際の位置を計算するために使用される。換算に、使用される全ての交換対物レンズの結像倍率が入るので、それぞれの対物レンズのモニター座標がステージ座標の単位で校正される必要がある。

このため、良検出可能な物体が、顕微鏡ステージを移動させることによりモニター10上でx-およびy方向に移動される。それぞれのモニター位置が、モニター10の受像面上の物体をカーソルマーク30の先端で標識することによりコンピュータに送られる。コンピュータが、対応する座標-およびモニター位置からx-およびy方向の校正係数を測定する。それぞれの対物レンズに関する校正係数が、コンピュータ11に永久的に記憶される。

識し、

2. 標識された細胞へコンピュータ制御下に注射し、かつ

3. 次の視野を自動的に搬入すること

が、所望数の細胞が注射されるか、ないしは全ての所定の視野が連続的に処理されるまで繰返される。

注射がなんらかの理由から早期に中止されねばならない場合、この注射は、細胞容器がその間に顕微鏡ステージ5上のホルダーから除去されたとしても、任意の時点で適当な位置で続行されることができる。この場合必要なのは、像座標系を、“容器位置”下に記載せるように再び容器底面の基準標線に合せることだけである。

細胞座標が選択的にまた永久的に記憶されるので、その後の時点で、細胞が注射された全ての視野を限定的に多数回搬入することができる。従って、これら細胞の成長を、注射されなかった細胞と比較して追跡することが可能である。

装置の他の改善法

“データ入力”なる表題下に記載せるように、実際の注射前に、コンピュータに使用対物レンズが伝達される。付加的にこの工程が簡単化されうるのは、モーター駆動の対物レンズレボルバが使用され、かつレボルバ位置およびそれに関連する対物レンズにコンピュータにより読取可能な符号が配置されている場合である。この場合、使用された対物レンズの使用者による手動入力がなくなる。

これまでに記載された装置において、映像面の細胞の標識が、使用者による可視的観察下に標識に関連する細胞に付することにより手動により行なわれる。この工程が、関連する細胞の選択および細胞座標の測定を例えば映像解析装置を使用する重心形成により行なうことにより自動化されることができる。

さらに前述の装置は、液体の細胞への注射だけでなく、細胞からの液体ないしは細胞培養からの全細胞の吸引にも適当である。

最後に、関連する細胞を標識しかつその座標を容器底面の基準標線に相対的に記憶するまでの、この方法の第1の部分、その発育（成長、運動、形態学的変化等）が長期間にわたり相互作用的に追跡されるべき生細胞を、細胞が注射ないしは吸引されることなく“仮想的”に標識するためにも適当である。

図面につき記載せる、コンピュータ支援形の微量注射装置は、前記公知技術に挙げられた装置よりも単位時間当たり極めて多数の細胞が注射されることができる。毎時1500個の細胞を注射することが完全に可能であると判明したが、このことは公知の方法の5倍の増速を表わす。このことは、毛管自体の容器中での微動位置決めと比べ、カーソルマークの受像面での迅速な位置決めが可能であることを前提とするだけでなく、穿刺運動および注射圧力の確実なコンピュータ制御により、毛管の破断およびそれと関連して時間のかかる交換および再調整を生じることが極めて希であるという事情にも負うて

いる。

4 図面の簡単な説明

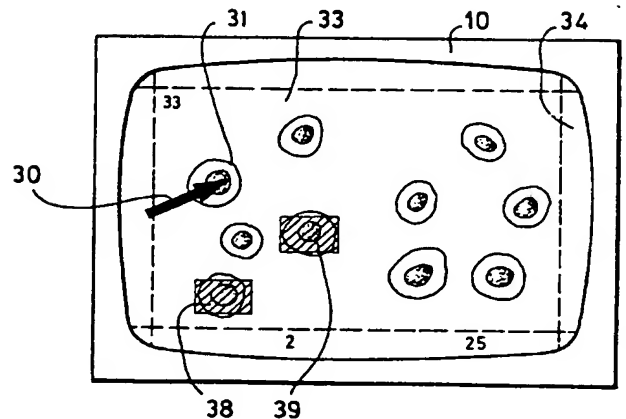
第1図および第2図は本発明による装置の1実施例につきそれぞれその接続を略示するブロック回路図およびその構造を略示する斜視図、第3図は第1図中のモニターの画像の1実施例を示す平面図、および第4図は第2図中のサンプル容器を拡大して示す斜視図である。

1…倒立顕微鏡、2…TVカメラ、3…微動マニピュレータ、4…注射用毛管、5…走査ステージ、7…対物レンズ用レボルバ、8…耐圧チューブ、9…注射装置、10…モニター、11…コンピュータ、12…グラフィックタブレット、13…グラフィックカード、14…タブレットインターフェイス、15…注射装置インターフェイス、17…モーター制御部、18…サンプル容器、19、20…ステージ運動用駆動装置（x、y方向）、21…マニピュレータ駆動装置（z方向）、24、26…ホルダ調節ノブ、27…毛管ホルダ、29…ホルダの軸、

30…矢形のカーソル、32…コンデンサ、33、34…区画に対応する視野、35a、35b…基準標線、36…顕微鏡の軸、38、39…方形の区域標識

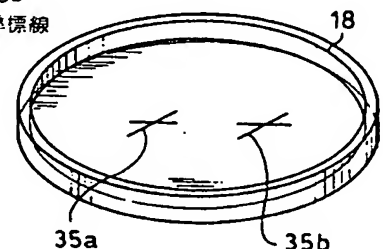
30…マーカー
31…細胞
33,34…区画

Fig. 3



18…容器
35a, 35b
…基準標線

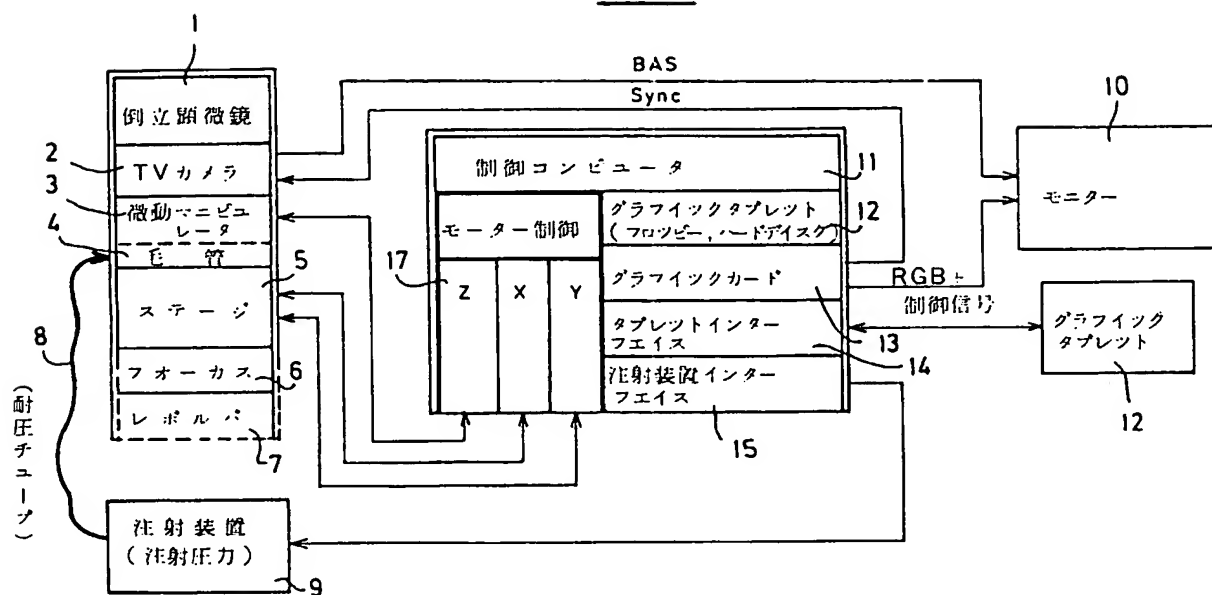
Fig. 4



代理人 弁理士 矢野敏雄



Fig. 1



- 4…毛管
 5…細胞キャリヤ
 19, 20, 21…位置決め装置
 40…毛管先端

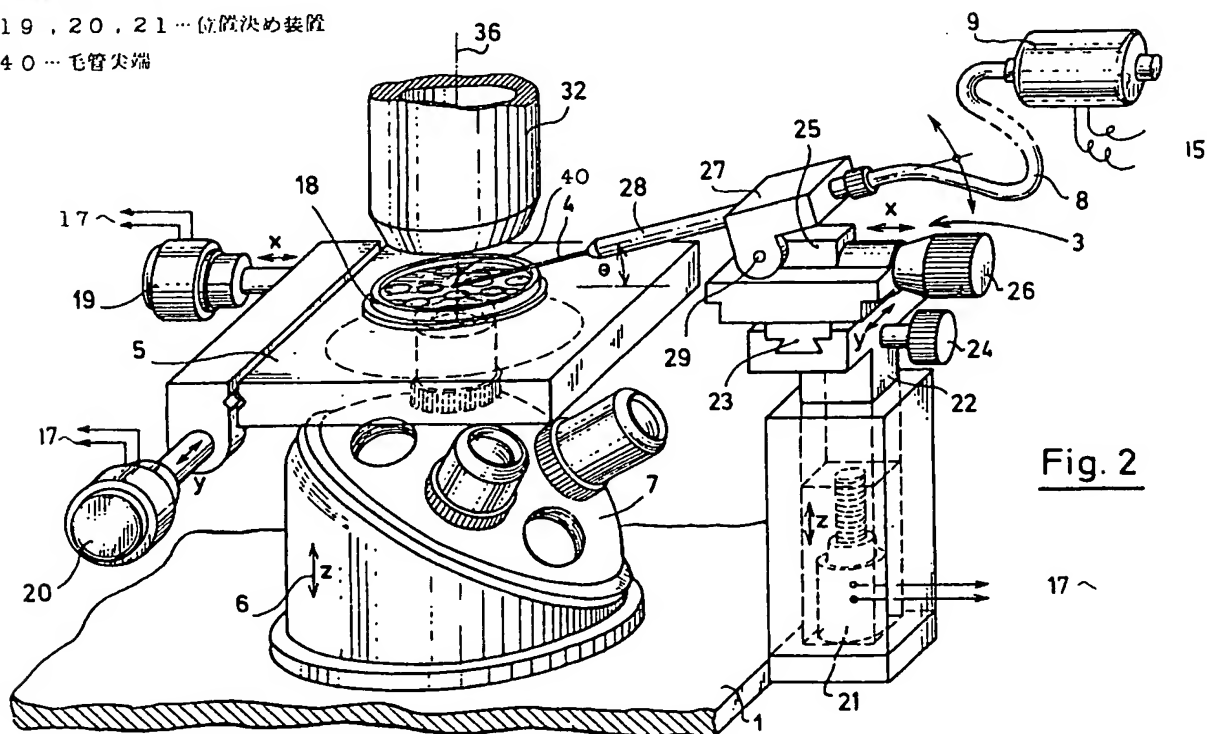


Fig. 2

第1頁の続き

⑤Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号
G 02 B 21/32 21/36		8708-2H 8708-2H
⑦2発 明 者	フオルカー・ヴィルケ	ドイツ連邦共和国アーレン15・クレ－エンフェルシュトラ ーセ 40
⑦2発 明 者	ヴィルヘルム・アンゾ ルゲ	ドイツ連邦共和国ガイベルク・ハイデルベルガーシュトラ ーセ 49

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.